DOI:10.11931/guihaia.gxzw202408007

秋茄 *KoNAC*25 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

杨党[1,2], 蒋文骏[1], 王永峰[3], 王建强[4], 董超[4], 杜照奎[1,2*]

(1. 台州学院 生命科学学院，浙江 台州 318000；2. 台州学院 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室, 浙江 台州 3180001；3. 台州循环经济发展有限公司, 浙江 台州 318000；4. 浙江省水文地质工程地质大队, 浙江 宁波 315000)

摘要：NAC 转录因子在植物中广泛存在且为植物所特有，在调节植物生长发育、激素信号转导和逆境胁迫响应等方面发挥着重要作用。前期工作中，从红树植物秋茄(*Kandelia obovata*)基因组中鉴定到一个受低温诱导的 *NAC* 基因 *KoNAC*25 (GenBank 登录号 PP860407)。为探究 *KoNAC*25 基因是否参与秋茄盐胁迫响应，该研究通过 RT-PCR 技术从秋茄叶片 cDNA 中克隆了 *KoNAC*25 基因，并对其进行序列特征、系统进化、亚细胞定位及基因表达分析等。结果表明：（1）秋茄 *KoNAC*25 基因的开放阅读框(ORF)全长为 858 bp，共编码 285 个氨基酸，分子量为 32.9 kDa，理论等电点为 8.53，为亲水性蛋白，不含信号肽且无跨膜结构。（2）序列同源比对显示，KoNAC25 蛋白 N 端具有一个 NAM 超家族结构域，由五个保守的亚结构域构成，属于 NAM 亚家族成员。（3）系统进化树表明秋茄 KoNAC25 转录因子与大戟科的蓖麻(*Ricinus communis*)、木薯(*Manihot esculenta*)和橡胶树(*Hevea brasiliensis*)等植物亲缘关系较近。（4）亚细胞定位试验证实，KoNAC25 蛋白定位于细胞核。（5）qRT-PCR 分析结果表明，*KoNAC*25 基因在叶中表达量显著高于花中，同时该基因能够被盐(NaCl)和脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导表达上调，分别在处理 12 和 6 h 时达到峰值。综上所述，*KoNAC*25 参与了秋茄盐胁迫响应的相关调控，该结果为进一步研究秋茄 *KoNAC*25 基因在盐胁迫下的功能及其表达调控机理提供了参考。

关键词：秋茄，*NAC*25 基因，基因克隆，亚细胞定位，表达模式

中图分类号：Q941　　文献标志码：A　　文章编号：

Cloning, subcellular localization and expression analysis of transcription factor gene *KoNAC*25 in *Kandelia obovata*

YANG Dang[1, 2], JIANG Wenjun[1], WANG Yongfeng[3], WANG Jianqiang[4], DONG Chao[4], DU Zhaokui[1, 2*]

(1. *School of Life Sciences*, *Taizhou University*, Taizhou 318000, Zhejiang, China; 2. *Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation*, *Taizhou University*, Taizhou 318000, Zhejiang, China; 3. *Taizhou Circular Economy Development Co*., *Ltd*., Taizhou 318000, Zhejiang, China; 4. *Zhejiang Institute of Hydrogeology and Engineering Geology*, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

Abstract: NAC transcription factors are widely present in plants and unique to plants, which play important roles in regulating plant growth and development, hormone signaling, and the response

基金项目：浙江省基础公益研究计划项目(GN21C160013)；浙江省自然资源厅科技项目(2021-43)；浙江省省级地质专项资金项目([省资]2024010)；台州市科技计划项目(22nya05)。

第一作者：杨党(1983—), 助理工程师，要从事森林培育研究，(E-mail) 1798847892@qq.com。

***通信作者**：杜照奎，博士，副教授，硕士生导师，主要从事红树林生态学研究，(E-mail) dzk@tzc.edu.cn。

to adverse stress. In our previous work, a low-temperature-induced *NAC* gene, *KoNAC*25 (GenBank accession number PP860407), was identified from the genome of the mangrove *Kandelia obovata*. To investigate whether the *KoNAC*25 gene of *K. obovata* is involved in the response to salt stress conditions, this study cloned the *KoNAC*25 gene from the cDNA of *K. obovata* leaves via RT–PCR and performed sequence characterization, phylogenetic evolution subcellular localization, and gene expression analyses. The results were as follows: （1）The open reading frame (ORF) of the *KoNAC*25 gene was 858 bp in length and encoded 285 amino acids, with a molecular weight of 32.9 kDa and a theoretical isoelectric point of 8.53. KoNAC25 is a hydrophilic protein and contains no signal peptide or transmembrane structure, and its secondary structure is predominantly random coils (58.95%). （2）Amino acid sequence homology analysis showed the N-terminus of the KoNAC25 protein has a NAM superfamily structural domain, which consists of five conserved substructural domains (ABCDE) and belongs to the NAM subfamily. （3）The phylogenetic tree revealed that the KoNAC25 transcription factor of *K. obovata* is similar to the transcription factors of *Ricinus communis*, *Manihot esculenta,* and *Hevea brasiliensis* in the family Euphorbiaceae. （4）The subcellular localization test confirmed that the protein was localized in the nucleus, which was consistent with bioinformatics prediction. （5）qRT–PCR analysis revealed that the expression of the *KoNAC*25 gene was significantly greater in leaves than in flowers and could be induced to upregulate its expression by NaCl (200 mmol·L^{-1}) and ABA (100 μmol·L^{-1}), which peaked at 12 and 6 h of treatment, respectively; however, the expression level of this gene was not induced by salicylic acid (100 μmol·L^{-1}) and Methyl Jasmonate (100 μmol·L^{-1}). In summary, *KoNAC*25 is involved in the regulation of the salt stress response in *K. obovata*, and the results provide a reference for further research on the function of the *KoNAC*25 gene and its expression regulatory mechanism under salt stress in *K. obovata*.

Key words：*Kandelia obovata*, *NAC*25 gene, gene cloning, subcellular localization, expression pattern

红树林是指生长在热带、亚热带海岸潮间带，以红树植物为主体的常绿乔木或灌木组成的湿地木本植物群落，在防风消浪、固岸护堤、净化水体、促淤造陆、蓝色碳汇和维持生物多样性等方面具有重要功能(郑熊等, 2023)。作为最有价值和生产力最高的沿海生态系统之一，红树林生态系统具有高生产力、高回报率、高分解率和高抗极端天气事件能力等特征(Himes-Cornell et al., 2018; Tatongjai et al., 2021; Wang & Gu, 2021)。中国红树林天然分布于海南、广西、广东、福建和台湾等省区(范航清和王文卿, 2017)。但由于上世纪 60 年代以来的毁林围海造地等人类不合理开发活动，使我国红树林面积骤减，全国红树林总面积不到 1.5×10^4 hm^2，尚不到历史上红树林资源最高时期的 1/3 (林鹏, 2003; 赵晟等, 2007)。近年来，我国的红树林保护修复工程取得一定进展，但仍面临污染、围垦、采挖、城市建设以及外来物种入侵等问题(但新球等, 2016)。

为适应复杂多变的生态环境，植物在长期的适应过程中进化出多种响应胁迫的防御机制，能够通过转录因子与下游逆境胁迫相关基因启动子区的顺式作用元件结合，从而调控抗逆相关基因的表达，进而提高植物对逆境的适应性(Lan Thi Hoang et al., 2017)。NAC 转录因子广泛分布于多种植物中，包含 3 个超家族(Diao et al., 2020)，是植物最大的转录因子家族之一(Shao et al., 2015)。Souer 等(1996)在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中克隆到第一个 NAC 转录因子 *NAM* (no apical meristem)基因。Aida 等(1997)发现矮牵牛 *NAM* 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *ATAF1/2* (Arabidopsis transcription activation factor)和 *CUC2* (cup-shaped cotyledon)基因编码蛋白的 N 端都包含一段保守序列，遂取上述 3 个基因的首字母将该转录因子命名

为 NAC。随后，研究人员在水稻(*Oryza sativa*)、葡萄(*Vitis vinifera*), 马铃薯(*Solanum tuberosum*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、大豆(*Glycine max*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)等多种植物中相继发现了数量不等的 NAC 转录因子(Tweneboah & Oh, 2017)。

NAC 转录因子家族成员典型特征是其 N 端有一个高度保守的 DNA 结合结构域(约由 150 个氨基酸组成)，该结构域能与 DNA 或蛋白质结合(Olsen et al., 2005)；而 C 端结构则具有多样性，是转录激活或抑制功能域(Nakashima et al., 2012)。研究表明，过量表达 *ATAF1* 基因的拟南芥会出现明显的矮化和开花延迟现象(Jensen et al., 2013)；拟南芥中过表达谷子(*Setaria italica*)基因 *SiNAC1* 可提高植株内 ABA 的表达水平，进而促进拟南芥叶片衰老(Ren et al., 2017)；大豆(*G. max*)基因 *GmNAC20* 转入水稻后诱导了侧根的形成，并提高了水稻的耐寒性和耐盐性(Yarra & Wei, 2021)；水稻转录因子基因 *OsNAC*6 的表达对高盐、低温、ABA 和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)等多种处理均有正反馈 (Ohnishi et al., 2005)，过表达 *OsNAC6* 水稻植株虽然出现生育期延迟和减产现象，但对脱水、高温胁迫以及稻瘟病等表现出良好的耐受性(Nakashima et al., 2007)。可见，NAC 蛋白在植物发育、衰老、形态发生以及抵御逆境胁迫等方面发挥着重要作用(Singh et al., 2021)。

秋茄隶属红树科秋茄树属，为灌木或小乔木，是中国地理分布最广、最耐寒的红树植物(Chen et al., 2017)。作为东亚地区主要的红树植物，秋茄是我国红树林生态恢复常用的树种之一，已在国内多个沿海省份人工造林工程取得了良好成效(陈鹭真等, 2006; 吴伟志等, 2022; 周治刚等, 2024)。秋茄分布于生境恶劣的潮间带，常受温度(Du et al., 2022b)、盐度(Nizam et al., 2024)、水淹(Liu et al., 2023)、上升流(Li et al., 2022)以及人类活动所导致的富营养化(Wang et al., 2021)等影响。因而，秋茄可视作研究植物环境适应的理想试验材料，但目前关于其转录因子对其盐胁迫的响应及机制研究相对较少。

前期研究中，本课题组从基因组水平上鉴定出 79 个秋茄 *NAC* 基因家族成员，转录组数据显示 *KoNAC*25 的表达受低温诱导显著升高，表明它可能参与了低温胁迫响应(Du et al., 2022a)，但尚不清楚 *KoNAC*25 基因是否参与了秋茄的盐胁迫应答。基于此，本研究以秋茄叶片 cDNA 为模板，采用逆转录 PCR 技术克隆得到基因 *KoNAC*25，并对其进行生物信息学和亚细胞定位分析，并考查 *KoNAC*25 基因在不同组织及盐胁迫下的表达水平，以期为剖析基因 *KoNAC*25 在秋茄盐胁迫中的功能及其分子调控机理提供基础。

1. 材料与方法

1.1 试验材料

2023 年 4 月下旬，在三门县蛇蟠乡红树林区(121°34′ E, 29°8′ N)采集 4 年生秋茄的根、茎和叶，7 月下旬采集花，10 月下旬采集果实，洗净后装入自封袋中，置于冰盒中迅速带回实验室，液氮速冻后，-80 ℃超低温冰箱保存，用于后续 *KoNAC*25 基因的组织表达分析。

1.2 试验设计

2023 年 6 月中旬，插植采自蛇蟠乡健康、成熟的秋茄胚轴于海泥中，植物光照培养箱内培养。待四叶全展时，进行盐胁迫和外源激素处理。即在幼苗叶片(叶面和叶背)分别喷施 200 mmol·L^{-1} NaCl 溶液、100 μmol·L^{-1} 水杨酸(salicylic acid, SA)、100 μmol·L^{-1} ABA 和 100 μmol·L^{-1} MeJA。喷施处理后 0、1、3、6、12 h 和 24 h 采集顶端嫩叶，液氮速冻后，-80 °C 超低温冰箱保存，用于 *KoNAC*25 基因的表达分析，每个样本重复 3 次。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

使用 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(天根生化，北京)提取秋茄不同组织以及不同处理叶片的总 RNA，1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。以提取的总 RNA 为模板，用 TIANScript II cDNA 反转录试剂盒(天根生化，北京)合成 cDNA 第一链；接着加入 dNTPs、

RNase H、DNA 聚合酶 I 和缓冲液合成 cDNA 第二链(程少禹等, 2020)。通过 Nanodrop ND-1000 微量紫外分光光度计(Thermo，美国)测定 cDNA 的浓度。

1.3.2 *KoNAC*25 基因克隆

以反转录所得的 cDNA 为模板，扩增秋茄 *KoNAC*25 基因的 ORF。反应体系为 50 ng 反转录 cDNA 模板 2 μL，10 μmol·L^{-1} 上下游引物各 1 μL，10 mmol·L^{-1} dNTPs 1 μL，1 U·$μL^{-1}$ *Taq* DNA 聚合酶 1 μL，ddH_2O 补至总体积 25 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min；接着 94 °C 变性 30 s，然后 54 °C 退火 30 s，再 72 °C 延伸 60 s，共进行 30 个循环；最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，回收阳性条带进行纯化，连接纯化产物和 pUCm-T 载体，产物转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞，在添加氨苄青霉素的 Luria-Bertani (LB)固体培养基上筛选阳性克隆，经菌液 PCR 鉴定的阳性菌送上海生工生物工程有限公司测序确认(蒋文骏等, 2024)。文中所用引物序列见表 1。

表 1 引物信息及功能

Table 1 Information and function of Primers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
*KoNAC*25-F	ATGGATGAGACCACGCCGGA	基因扩增
*KoNAC*25-R	CTAAAATATCTCATGATAAC	Gene amplification
q*KoNAC*25-F	TCGATTCCACCCAACCGAAG	实时荧光定量 PCR
q*KoNAC*25-R	AATCTTGGCCAATCCAGGCA	Real-time fluorescence quantitative PCR
18S rRNA-F	GGGGCTCGAAGACGATCAGA	内参基因
18S rRNA-R	TTAAGCCGCAGGCTCCACTC	Internal reference gene

1.3.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 9.0 软件对秋茄 *KoNAC*25 基因的 ORF 进行翻译，得到 KoNAC25 的蛋白序列，提交 GenBank 数据库。蛋白质的理化性质分析在 ProtParam 网站完成；亲/疏水性分析和磷酸化位点的预测分别由 ProtScale 和 NetPhos 3.1 完成；信号肽和跨膜结构的预测分别由 SignalP 4.1 和 TMHMM 2.0 完成；亚细胞定位由 CELLO 完成；蛋白二级和三级结构分别由 SOPMA 和 SWISS-MODEL 完成；保守结构域预测由 CDD 完成。通过在线程序 Blastp 在 GenBank 数据库中查找与 KoNAC25 同源的蛋白质序列，利用 DNAMAN 9.0 进行多序列比对，并用 MEGA 5.05 构建同源蛋白的系统进化树(魏灵敏等，2022)。以上各在线工具网址见表 2。

表 2 生物信息学在线工具

Table 2 Online bioinformatics tools

软件 Software	网址 Website	功能 Function
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	理化性质分析 Physical and chemical property analysis
ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/	亲/疏水性预测 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity
NetPhos 3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	磷酸化位点预测 Phosphorylation site prediction
SignalP 4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/	信号肽预测

		Signal peptide prediction
TMHMM 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/	跨膜结构域预测 Prediction of transmembrane domains
CELLO	http://cello.life.nctu.edu.tw/	亚细胞定位预测 Prediction of subcellular localization
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	二级结构预测 Secondary structure prediction
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/	三级结构预测 Tertiary structure prediction
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	保守结构域预测 Conservative structural domain prediction
Blastp	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome	同源蛋白质序列搜索 Search for homologous protein sequences

1.3.4 亚细胞定位分析

将*KoNAC*25基因的ORF克隆到表达载体pCAMBIA1300-GFP中，与绿色荧光蛋白GFP基因融合表达。将空载体和重组载体分别与细胞核定位marker混合后转化农杆菌感受态细胞GV3101，再分别导入拟南芥叶片原生质体，用激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000 viewer，日本)进行成像。原生质体的分离和 PEG介导的转化按照Yoo等(2007)方法进行。

1.3.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析

以秋茄18S rRNA基因为内参，设计并合成定量PCR引物(表1)。利用实时荧光定量PCR检测*KoNAC*25在秋茄叶、茎、根、花和果实组织中的表达水平，以及在盐和植物激素诱导下，叶片中*KoNAC*25基因的表达量。反应体系为cDNA 2 μL，上下游引物各1 μL，SYBR Green Master mix 10 μL，ddH_2O补至20 μL。扩增程序为95 °C预变性2 min，95 °C变性20 s，58 °C退火20 s，72 °C延伸20 s，共40个循环。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法(Livak & Schmittgen, 2001)计算*KoNAC*25基因的相对表达量，每个样本重复3次，使用SPSS 13.0软件进行数据分析。

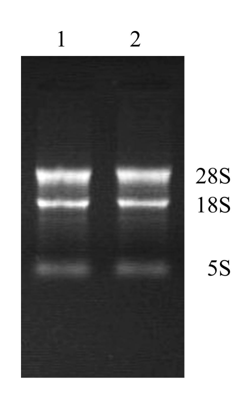
1.3.6 数据分析

采用软件SPSS 13.0进行单因素方差分析(one-way ANOVA)，用Duncan法进行多重比较(显著水平为 $P < 0.05$)。数据以平均值±标准差表示，每个数据设置3个生物学重复。

2. 结果与分析

2.1 秋茄叶片总RNA的提取

秋茄叶片总RNA提取后用1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测(图1)。结果显示，凝胶上呈现非常清晰的28S和l8S rRNA条带及微量的5S rRNA条带，且28S较l8S rRNA条带更为明亮，没有明显拖尾现象，表明RNA质量较高，可用作后续cDNA第一链合成的模板。



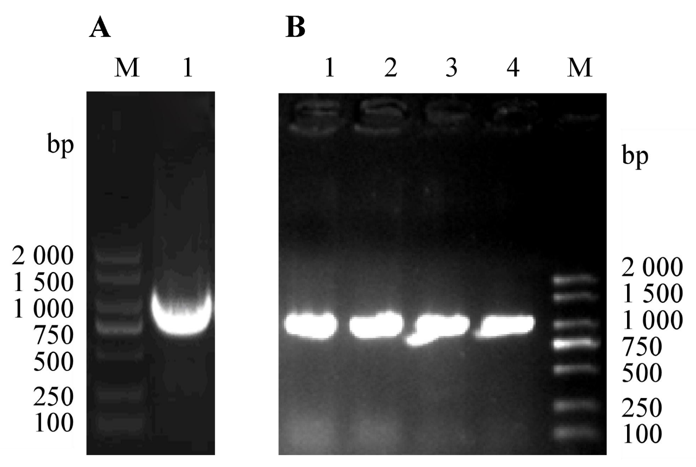
泳道 1 和 2，秋茄叶片总 RNA。

Lane 1 and 2, total RNA extraction from the leaf of *Kandelia obovata*.

图 1 秋茄总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA extraction from the leaf of *Kandelia obovata*

以反转录合成的 cDNA 第一链为模板，经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳，从图 2：A 可以看出，在分子量 750~1 000 bp 之间出现一条的特异性条带。与 pUCm-T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞，LB 固体培养基培养。挑取平板上单克隆菌落，进行菌液 PCR 检测，电泳凝胶上同样在分子量 1 000 bp 附近呈现一条明亮的条带(图 2：B)，经测序后分析该基因序列长度为 858 bp，与预期大小一致，并且具有完整的 ORF，编码 285 个氨基酸，表明已克隆获得了秋茄 *KoNAC*25 基因序列，该序列已提交至 Genbank，登录号为 PP860407。



A.泳道 M，DL 2000 DNA 分子量标记；泳道 1，*KoNAC*25 基因的 PCR 产物。

B.泳道 M，DL 2000 DNA 分子量标记；泳道 1、2、3、4，转化 *KoNAC*25 基因重组菌单菌落的 PCR 产物。

A. Lane M, DNA marker DL2000; Lane 1, PCR products of *KoNAC*25.

B. Lane M, DNA marker DL2000; Lane 1, 2, 3, 4, PCR products of single colony transformed gene *KoNAC*25.

图 2 *KoNAC*25 基因的扩增(A)和阳性克隆菌液 PCR 鉴定(B)

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR amplified products of *KoNAC*25 (**A**) and positive clones identified by bacterial PCR (**B**)

2.3 秋茄 *KoNAC*25 基因的生物信息学分析

2.3.1 秋茄 KoNAC25 蛋白的氨基酸组成与理化性质分析

秋茄 KoNAC25 蛋白由 20 种常见氨基酸组成，共编码 285 个氨基酸，其中含量最多的是亮氨酸(10.2%)，其次为赖氨酸(7.7%)和脯氨酸(7.7%)，最少的为半胱氨酸(1.4%)；酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)占 13.4%，碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸和组氨酸)占 17.2%(表 3)。该蛋白的分子式为 $C_{1479}H_{2295}N_{403}O_{424}S_{12}$，分子量为 32.9 kDa，理论等电点为 8.53。

表 3 KoNAC25 蛋白的氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition o the protein KoNAC25

氨基酸的种类 Type of amino acid	氨基酸的数目 Quantity of amino acids	占氨基酸总量的百分比 Percent of total amino acid （%）	氨基酸的种类 Type of amino acids	氨基酸的数目 Quantity of amino acids	占氨基酸总量的百分比 Percent of total amino acid （%）
丙氨酸 Ala	11	3.9	亮氨酸 Leu	29	10.2
精氨酸 Arg	19	6.7	赖氨酸 Lys	22	7.7
天冬氨酰 Asn	8	2.8	甲硫氨酸 Met	8	2.8
天冬氨酸 Asp	17	6.0	苯丙氨酸 Phe	12	4.2
半胱氨酸 Cys	4	1.4	脯氨酸 Pro	22	7.7
谷氨酰胺 Gln	8	2.8	丝氨酸 Ser	19	6.7
谷氨酸 Glu	21	7.4	苏氨酸 Thr	17	6.0
甘氨酸 Gly	19	6.7	色氨酸 Trp	7	2.5
组氨酸 His	8	2.8	酪氨酸 Tyr	10	3.5
异亮氨酸 Ile	13	4.6	缬氨酸 Val	11	3.9

2.3.2 秋茄 KoNAC25 亲水性/疏水性和蛋白磷酸化位点预测

亲水性/疏水性分析结果显示，KoNAC25 蛋白序列中亲水性氨基酸有 197 个(Y 轴负半轴)，而疏水性氨基酸仅 88 个(Y 轴正半轴)，总体而言，该蛋白的亲水性预测值为-0.637，为亲水性蛋白(图 3：A)。磷酸化位点预测结果表明，KoNAC25 蛋白含有 13 个丝氨酸(Ser)、12 个苏氨酸(Thr)和 3 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点(图 3：B)，意味着该蛋白磷酸化时，可能主要发生在 Ser 和 Thr 两种氨基酸上。

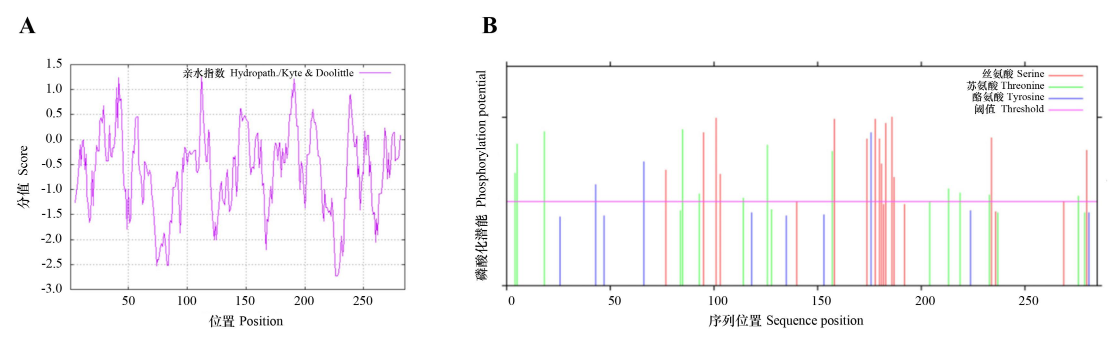


图 3 KoNAC25 蛋白亲水性/疏水性(A)和磷酸化位点(B)预测

Fig. 3 Prediction of hydrophilic/ hydrophobic properties (**A**) and phosphorylation sites (**B**) of KoNAC25 protein

2.3.3 秋茄 KoNAC25 蛋白信号肽、跨膜结构和亚细胞定位预测

信号肽预测结果中，S 值为信号肽分值，信号肽区域的分值较高；C 值为剪切位点分值，信号肽实际剪切位点处的 C 值较高；Y 值为综合剪切位点分值，由 C 值和 S 值计算得来，实际剪切位点由 Y 值决定(戚继艳等, 2011)，当最大 Y 值＞阈值 0.45 时，判定该编码蛋白存在信号肽(张颖等, 2018)。本研究中，KoNAC25 蛋白的 Y 值为 0.104(如图 4：A)，因此，推测该蛋白不含信号肽。跨膜结构域预测结果显示，KoNAC25 蛋白无跨膜结构，属于非分泌蛋白或非膜蛋白(图 4：B)。亚细胞定位结果显示，秋茄 KoNAC25 蛋白定位前四位依次为细胞核(2.234)、细胞质(1.463)、线粒体(0.924)和叶绿体(0.105)，表明 KoNAC25 蛋白存在于细胞核的可能性最大。

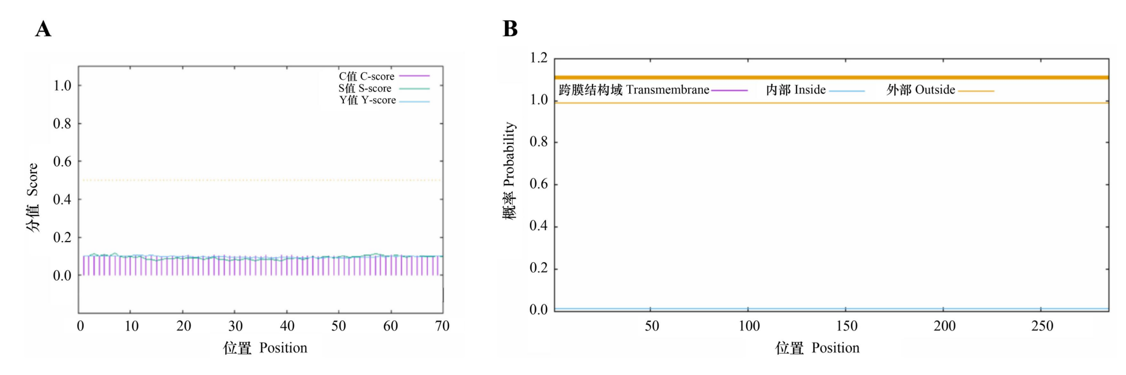
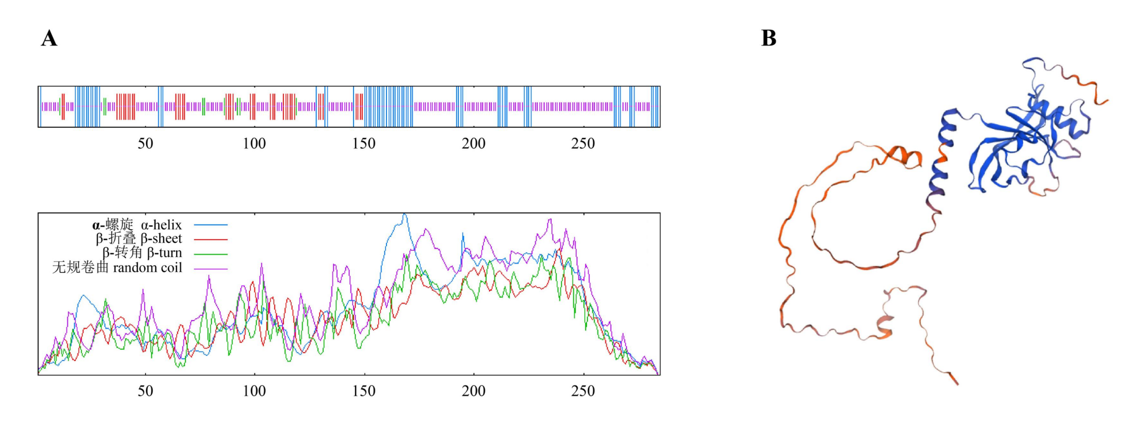


图 4 KoNAC25 蛋白信号肽(A)和跨膜结构域(B)预测

Fig. 4 Signal peptide (**A**) and transmembrane domain prediction (**B**) of KoNAC25 protein

2.3.4 秋茄 KoNAC25 蛋白的二级结构和三级结构预测

采用在线软件 SOPMA 对 KoNAC25 进行二级结构预测，结果表明，该蛋白二级结构主要由无规卷曲、α-螺旋、延伸链及β-转角组成，其中无规卷曲(58.95%)和α-螺旋(24.21%)占比较高，而延伸链(13.68%)和β-转角(3.16%)占比较低(图 5：A)。利用 SWISS-MODEL 对秋茄 KoNAC25 蛋白三级结构预测建模(图 5：B)，结果显示该蛋白三级结构与模型(A0A0R4J4G2.1.A)的相似性为 71.33%，QMQE 得分为 0.68，表明该模型可靠性较高。



A. KoNAC25 蛋白二级结构分析(蓝线代表α-螺旋；红线代表延伸链；绿线代表β-转角；紫线代表无规卷曲)；**B**. KoNAC25 蛋白三级结构预测。

A. Secondary structural analysis of protein KoNAC25 (Blue line: α-helix; red line: extended chain; green line: β-turn; purple line: random coil. **B**. Tertiary structure prediction of protein KoNAC25.

图 5 KoNAC25 蛋白二级结构分析(A)及三级结构预测(B)

Fig. 5 Secondary structure analysis (**A**) and tertiary structure prediction (**B**) of KoNAC25 protein

2.3.5 秋茄 KoNAC25 蛋白的同源性比对及进化树分析

CDD 在线软件分析结果显示，秋茄 KoNAC25 蛋白的 10~137 位具有 NAM 保守结构域(图 6A)，表明该蛋白属于 NAC 蛋白中的 NAM 超家族成员。将 KoNAC25 蛋白序列提交至 NCBI 数据库，进行 BLAST 搜索并下载 NAC 序列，包括夏栎(*Quercus robur*，XP_050261731.1)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*，XP_021649172.2)、桃(*Prunus persica*，XP_007200527.1)、蓖麻(*R. communis*，XP_002525740.2)、玉米(*Zea mays*，NP_001183286.1)、小麦(*Triticum aestivum*，AVG22638.1)、大麦(*Hordeum vulgare*，KAE8777748.1)、高粱(*Sorghum bicolor*，XP_002439057.1)、水稻(*Oryza sativa*，AJO53625.1)、木薯(*Manihot esculenta*，ALC79008.1)、大豆(*Glycine. max*，AAX85983.1)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*，XP_016734429.1)、野西瓜

苗(*Hibiscus trionum*，GMJ12670.1)及美洲棉(*Gossypium raimondii*，XP_012449436.1) 等 14 个物种。使用 DNAMAN 9.0 对以上 15 个物种的同源 NAC 蛋白的氨基酸序列进行多重比对分析，结果显示，KoNAC25 与其他植物 NAC 转录 N-端氨基酸序列高度保守，可划分为 5 个保守的亚结构域，分别为 A-E(图 6：B)。

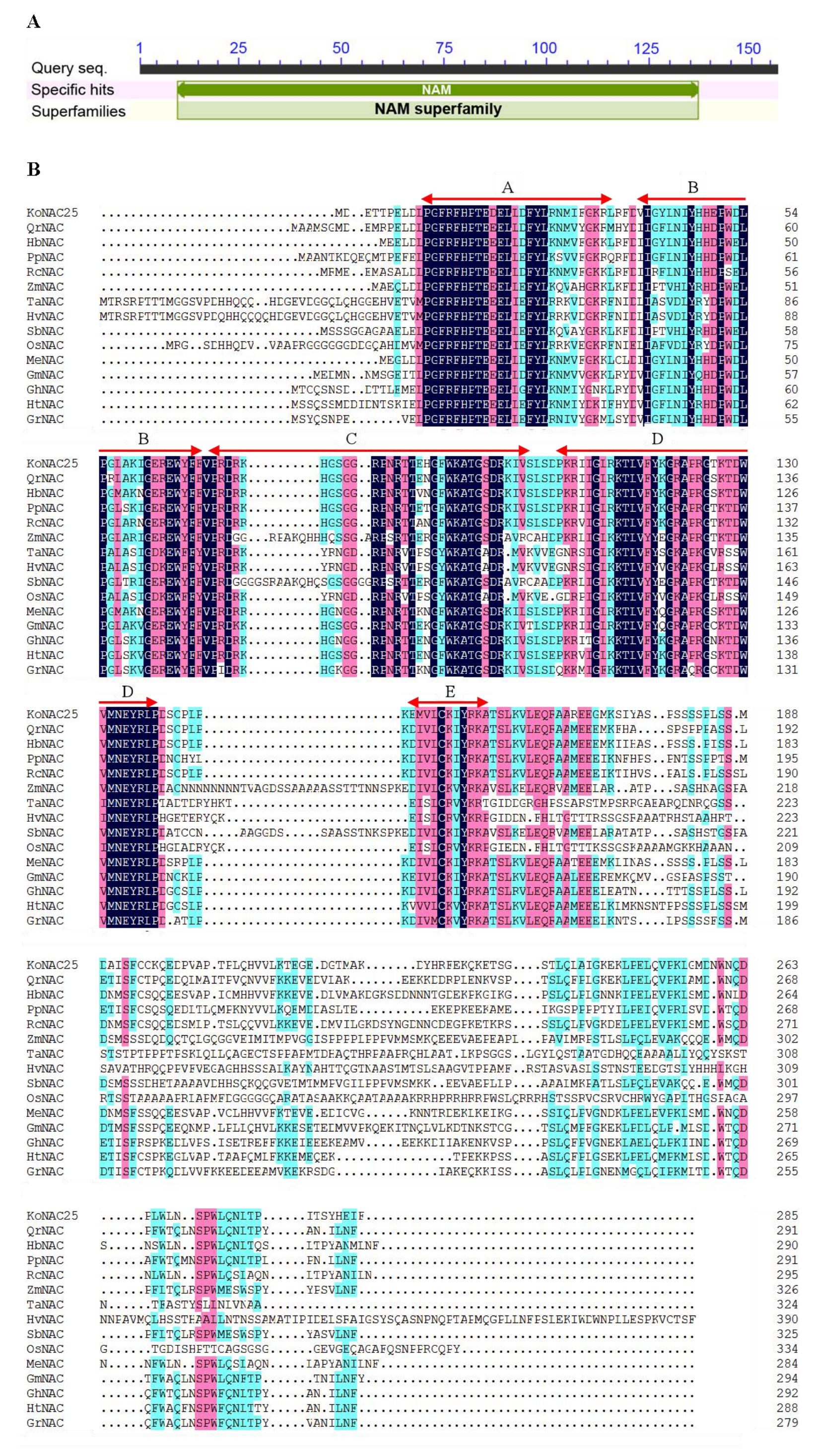


图 B 中深蓝色、粉红色和浅蓝色标出的序列分别表示同源性=100%、≥75%和≥50%。

Sequences in Fig. B highlighted in dark blue, pink, and light blue indicate homology =100%, ≥75%, and ≥50%, respectively.

图 6 KoNAC25 蛋白的保守结构域(A)及氨基酸序列比对(B)

Fig. 6 Conserved structural domains (**A**) and amino acid sequence alignment (**B**) of KoNAC25 protein

利用 MEGA5.05 软件采用邻接法构建 NAC 蛋白系统发育树(图 7)，结果表明，系统树可分为两大类：玉米、小麦及水稻等单子叶植物聚为一类；而橡胶树、蓖麻、大豆、陆地棉及桃等双子叶植物聚为一类。而且秋茄与大戟科的蓖麻、木薯及橡胶树亲缘关系相对较近。

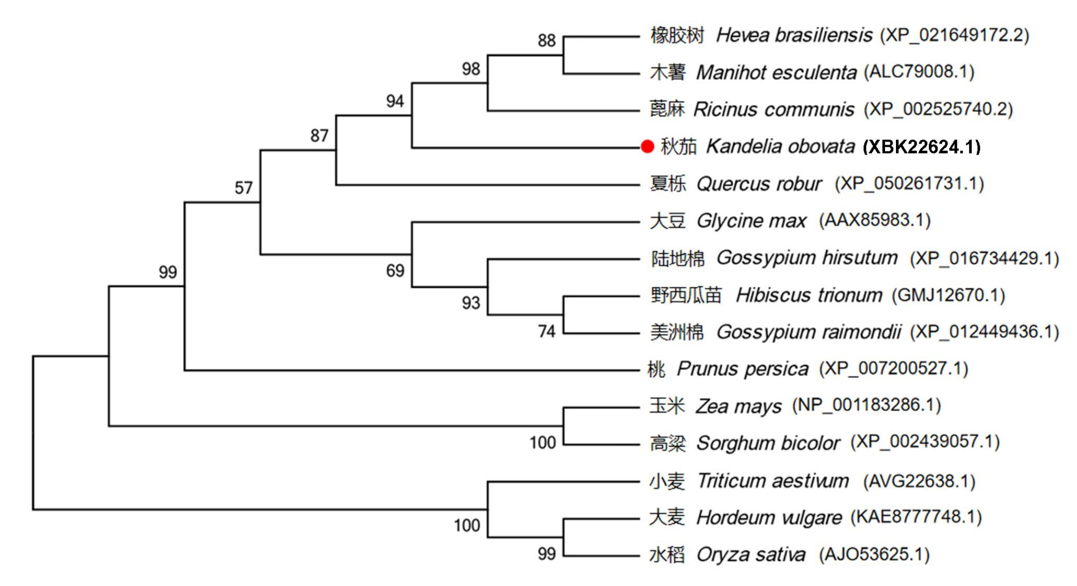


图 7 不同植物 NAC 蛋白的系统发育树

Fig. 7 Phylogenetic tree of NAC proteins from different plant species

2.3.6 KoNAC25 蛋白的亚细胞定位分析

为验证 KoNAC25 的亚细胞定位，采用绿色荧光蛋白技术进行了示踪。由图 8 可以看出，叶绿体自发荧光明亮，明场和叠加场下细胞形态完整，表明原生质体细胞生长状态良好。在瞬时转化空载体 pCAMBIA1300-GFP 的细胞中，GFP 基因高量表达，绿色荧光充满整个细胞；而在瞬时转化 pCAMBIA1300-KoNAC25-GFP 的原生质体中，绿色荧光与核定染料 mCherry 位置完全重合，主要分布在细胞核中，以上结果表明 KoNAC25 蛋白定位在细胞核。

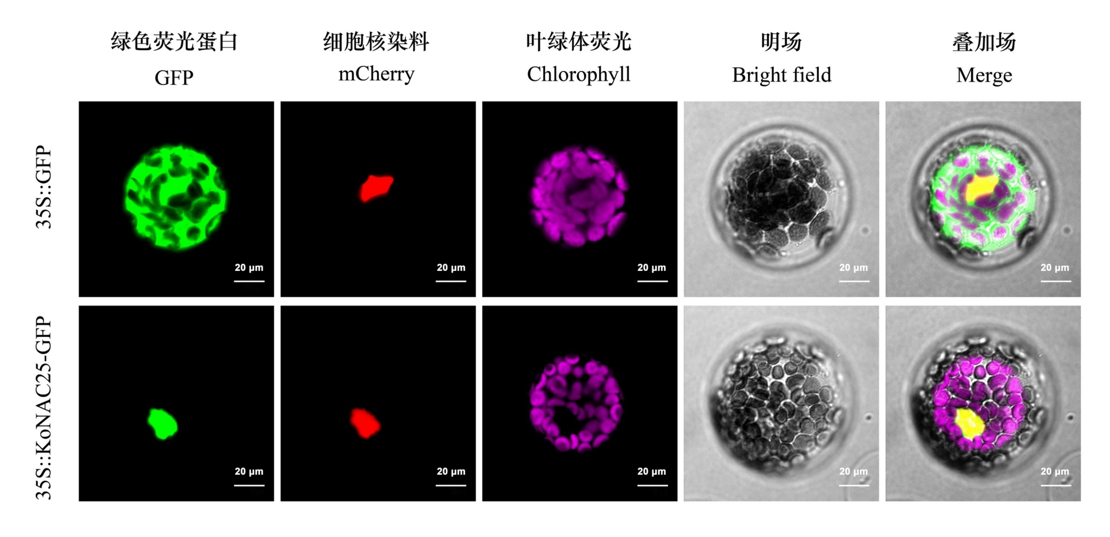


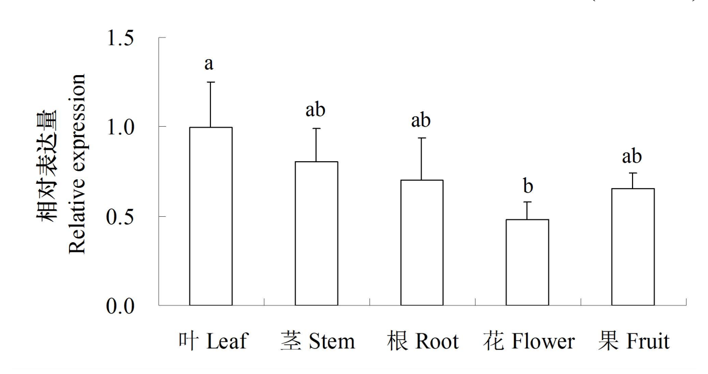
图 8 KoNAC25 蛋白亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of protein KoNAC25

2.3.7 秋茄 *KoNAC*25 基因在不同组织的相对表达量

为了解 *KoNAC*25 基因在秋茄中表达的组织特异性，采用 qRT-PCR 技术进行表达定量分析。结果表明，*KoNAC*25 基因在秋茄叶、茎、根、花和果实中均有表达，叶中表达量最高，花中表达量最低(图 11)。*KoNAC*25 基因在叶中的表达量是花中的 2.08 倍，两者差异显著(P <

0.05)；但叶中的表达量与茎、根和果实中的表达量则无显著差异($P > 0.05$)。



叶的表达水平作为其他组织表达量的相对标准，定义为 1，误差线表示标准差，不同小写字母表示在 0.05 水平上组织间差异显著。

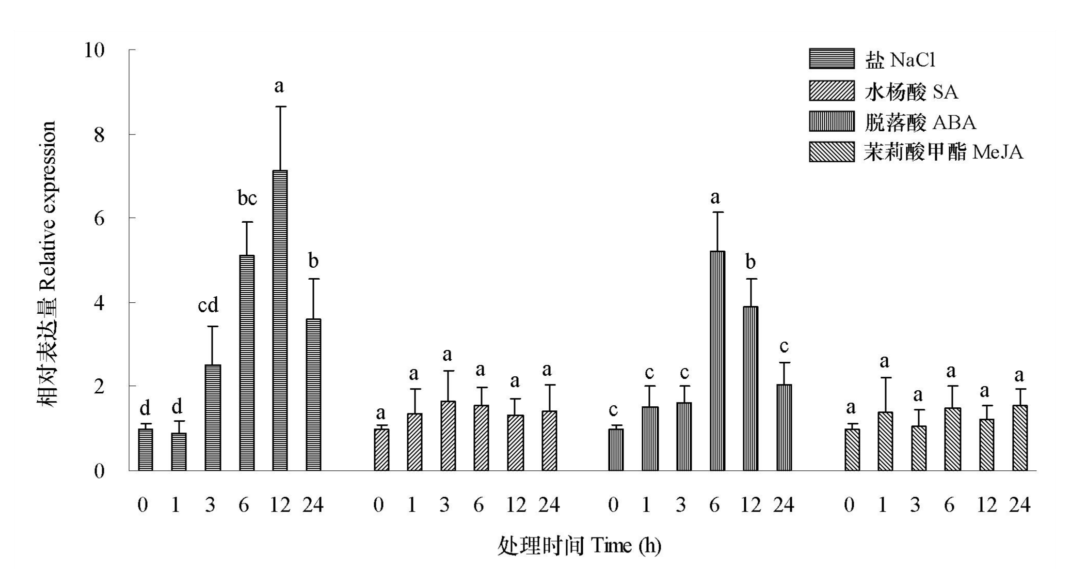
The expression level of leaf is defined as a relative standard for the expression of other tissues, with error bars indicating standard deviations, and different lower case letters indicating significant inter-tissue differences at the 0.05 level.

图 9 KoNAC25 基因在秋茄不同组织中的相对表达量

Fig. 9 Relative expression of *KoNAC*25 gene in different tissues of *Kandelia obovata*

2.3.8 秋茄 *KoNAC*25 基因对盐胁迫和植物激素处理的表达响应

为检验盐和植物激素能否调控 *KoNAC*25 基因的表达，采用 NaCl、SA、ABA 和 MeJA 三种激素处理幼嫩秋茄叶片，通过实时荧光定量 PCR 检测 *KoNAC*25 基因表达水平的变化(图 10)。结果表明，NaCl 和 ABA 处理均对 *KoNAC*25 基因的表达产生显著影响，而 SA 和 MeJA 的影响不显著。NaCl 处理后的 *KoNAC*25 基因表达呈现出先升高后下降的趋势，尤其是在 12 h 表达量最高，为对照的 6.98 倍；ABA 处理 6 h 时，*KoNAC*25 基因的表达量最高，随着处理时间延长其表达量逐渐降低。综上结果表明，秋茄 *KoNAC*25 的表达受 NaCl 和 ABA 的诱导。



处理时间为 0 h 的作为其他处理表达量的相对标准，定义为 1，误差线表示标准差，不同小写字母表示在 0.05 水平上同一处理下差异显著。

The processing time of 0 h is defined as a relative standard for other processing expressions, defined as 1, error bars represent standard deviations, and different lower case letters indicate significant differences under the same treatment at the 0.05 level.

图 10 NaCl 和不同植物激素处理下秋茄 *KoNAC*25 基因的表达模式

Fig. 10 Expression patterns of *KoNAC*25 gene in *Kandelia obovata* under NaCl and different plant hormones

3 讨论与结论

NAC 转录因子为植物所特有，是植物中数量最大的转录因子家族之一，该转录因子不仅广泛参与植物生长发育(如侧根生长、花器官形成、果实成熟和叶片衰老等)的调控过程，而且在应对多种逆境胁迫(如高盐、干旱、低温或高温等)方面也发挥着重要的作用(陈倩等, 2021)。随着多种植物基因组测序工作的完成，越来越多的 *NAC* 基因家族成员被鉴定出来，如拟南芥、水稻、马铃薯、大麦、小麦、番茄和棉花等(Masri & Kiss, 2023)。

前期工作中，我们从秋茄基因组中分离鉴定了 79 个 NAC 家族成员，其中成员 *KoNAC*25 的表达量受低温诱导显著升高 (Du et al., 2022a)。为进一步明确其结构与功能，本研究克隆了 *KoNAC*25 基因的全长(GenBank 登录号为 PP860407)，并对其编码蛋白的高级结构进行解析，旨在为揭示该转录因子的功能与机理奠定基础。亚细胞定位结果显示 KoNAC25 蛋白定位于细胞核，与大多数转录因子定位结果一致，推测 KoNAC25 作为转录因子主要在细胞核中发挥作用。

序列比对分析结果表明，KoNAC25 蛋白的 N 端具有一个典型的 NAC 结构域，该结构域由 5 个高度保守的亚结构域 A、B、C、D、E 构成，而作为转录调控区的 C 端保守性较低，符合 NAC 转录因子家族的特征，这也暗示着不同物种的 NAC 基因调控作用具有多样性(钟秋蔚等, 2023)。进化树结果表明，KoNAC25 蛋白与橡胶树(*H. brasiliensis*)、木薯(*M. esculenta*)和蓖麻(*R. communis*)等大戟科植物亲缘关系较近，而与禾本科单子叶植物相隔较远。据估算，红树科、大戟科和杨柳科共同祖先之间的分歧时间为 1.05—1.2 亿年前(Pootakham et al., 2022)。Shi 等(2020)基于多种植物叶绿体基因组构建系统进化树，结果显示，秋茄与海漆(*Excoecaria agallocha*)和蓖麻(*R. communis*)等大戟科植物的遗传距离较近(红树科植物除外)，这与我们的结果相一致。

研究表明，NAC 转录因子基因在不同植物组织中的表达量有较大差异，如：山荆子(*M. baccata*) *MbNAC*25 在新叶中表达量最高(Han et al., 2020)；枇杷(*Eriobotrya japonica*) *EjNACL*47 在果实中表达水平最高(Chen et al., 2021)；而辣椒(*Capsicum annuum*) *CaNAC*035 则在根中表达量最高(Zhang et al., 2020)，表明不同的 NAC 家族成员可能发挥功能的空间有所差异。本研究中 *KoNAC*25 基因在叶中表达量最大，显著高于花中，意味着该基因对生长的调控作用可能强于繁殖。

盐胁迫可通过渗透作用和离子毒害对植物的生长和发育产生不利影响(Alsamadany et al., 2023)，当植物感受到外界胁迫刺激后，可通过细胞内激素介导，将信号传递给应答因子，诱导一系列抗逆相关基因的表达来提高抗性，从而减少损伤(Devireddy et al., 2021)。刚毛柽柳(*Tamarix hispida*)受盐胁迫后，*NAC*24 基因表达量升高，过表达该基因提高了刚毛柽柳的耐盐能力(卢惠君等, 2019)。本研究结果显示，盐胁迫下 *KoNAC*25 基因的表达量逐步升高，在 12 h 时达到峰值，随着胁迫时间的延长逐渐降低，表明该基因的表达对盐胁迫有响应，可能参与秋茄盐胁迫后期应答。这与巨桉(*Eucalyptus grandis*) *EgrNAC*1 基因(孙丽娟等, 2017)、沙柳(*Salix psammophila*) *SpsNAC*034 基因(杨海峰等, 2022)和茶树(*Camellia sinensis*) *CsNAC*79 基因(孔洁玙等, 2024)对盐胁迫的响应模式较相似。

作为一种常见的植物激素，ABA 在调节植物抗逆方面发挥着重要作用，其含量的增加能够诱导多种防御基因表达量的上调，增强植物对盐、干旱、高温、低温等多种非生物胁迫的抵抗能力(Roychoudhury et al., 2013)。有报道指出，水稻 *OsNAC*5 基因可分别被盐和 ABA 诱导表达上调，但盐对 *OsNAC*5 的诱导作用可以被烟酰胺(ABA 效应抑制剂)中断(Sperotto et

al., 2009)，过表达 *OsNAC*5 基因的水稻植株累积更多的脯氨酸和可溶性糖，增强了植株对盐的抗性(Song et al., 2011)；而水稻 *OsNAC*3 基因被敲除后，降低了植株对 ABA 的敏感性，同时也增加了水稻对盐胁迫的敏感性，转录组结果表明 *OsNAC*3 基因被敲除水稻与 ABA 介导途径的相关基因表达量显著降低(Zhang et al., 2021)，上述研究意味着 *OsNAC*5 和 *OsNAC*3 基因的表达与控制均为 ABA 依赖型的。为探究 *KoNAC*25 的表达是否受到植物激素的诱导，本试验结果显示，ABA 处理 6 h 后，该基因的表达水平开始显著上升，意味着 ABA 可以诱导 *KoNAC*25 的表达，但 *KoNAC*25 对盐胁迫的响应是否依赖 ABA 信号通路仍需进一步研究。

除 ABA 之外，MeJA 和 SA 等植物激素也被认为是重要的信号分子，它们在多种植物防御中发挥关键作用。例如：番茄(*Solanum lycopersicum*)叶面喷施 50 μmol·L^{-1} MeJA 后，*SlNAC5* 的表达量在 1 h 时增加了 48 倍(Zhu et al., 2014)，而 100 μmol·L^{-1} MeJA 处理番茄(*S. lycopersicum*)后，*SlNAM*1 的表达迅速升高，在 6 h 后达到峰值(Li et al., 2016)；同样的，100 μmol·L^{-1} 的外源 MeJA 处理水稻(*O. sativa*)叶片，*OsNAC*19 的表达量在 4—24 h 显著增加(Lin et al., 2007)。Kou 等(2016)研究表明，100 μmol·L^{-1} 的外源 SA 喷施番茄(*S. lycopersicum*)叶面，*SNAC*4 在 1 h 后表达量显著上升，12 h 达到峰值；但 *SNAC*6 的表达量从 1 h 开始显著下降，48 h 内均低于对照；甘蓝型油菜(*Brasssica napus*)接受 100 μmol·L^{-1} 的外源 SA 处理后，*BnaNAC1*4.1 基因的表达不受影响(章冰馨等, 2024)。我们的结果表明，100 μmol·L^{-1} 的 MeJA 和 SA 对 *KoNAC*25 的表达无显著影响。综上所述，相同浓度的激素处理，不同物种的不同 NAC 家族成员响应程度并不相同；此外，*KoNAC*25 对外界因素的响应可能不依赖 MeJA 和 SA 途径。

NAC 转录因子在提高植物抗逆反应中起着重要作用，*KoNAC*25 基因可能参与了秋茄对盐害胁迫的响应，但其应答机制尚不清楚。后续可开展其转录活性和转基因等相关研究，探讨 *KoNAC*25 基因在抗盐中的作用机理。

参考文献：

AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, et al., 1997. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant [J]. The Plant Cell, 9(6): 841-857.

ALSAMADANY H, ALHARBY HF, AL-ZAHRANI HS, et al., 2023. Selenium fortification stimulates antioxidant-and enzyme gene expression-related defense mechanisms in response to saline stress in *Cucurbita pepo* [J]. Scientia Horticulturae, 312: 111886.

CHEN L, WANG W, LI QQ, et al., 2017. Mangrove species' responses to winter air temperature extremes in China [J]. Ecosphere, 8(6): e01865.

CHEN L, YANG Z, WANG W, et al., 2006. Critical tidal level for planting *Kandelia candel* seedlings in Xiamen [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 17(2): 177-181. [陈鹭真，杨志伟，王文卿，等，2006. 厦门地区秋茄幼苗生长的宜林临界线探讨 [J]. 应用生态学报，17(2): 177-181.]

CHEN Q, JING D, WANG S, et al., 2021. The putative role of the NAC transcription factor EjNACL47 in cell enlargement of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) [J]. Horticulturae, 7(9): 323.

CHEN Q, YOU S, XING K, et al., 2021. Research progress of NAC transcription factors in fruit trees [J]. Molecular Plant Breeding, 19(19): 6396-6405. [陈倩，游双梅，邢乐华，等，2021. 果树 NAC 转录因子的研究进展 [J]. 分子植物育种，19(19): 6396-6405.]

CHEN SY, XUAN LJ, DONG B, et al., 2020. Identification of differential metabolic pathways and key regulatory genes in the two flower bud differentiation processes of *Magnolia liliiflora* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 47(8):1490-1504. [程少禹，宣铃娟，董彬，等，2020.‘红元宝’紫玉兰两次花芽分化差异代谢通路及关键调控基因筛选 [J]. 园艺学报，47(8): 1490-1504.]

DAN X, LIAO B, WU Z, et al., 2016. Resources, conservation status and main threats of mangrove wetlands in China [J].

Ecology and Environmental Sciences, 25(7): 1237-1243. [但新球，廖宝文，吴照柏，等，2016. 中国红树林湿地资源、保护现状和主要威胁 [J]. 生态环境学报，25(7): 1237-1243.]

DEVIREDDY AR, ZANDALINAS SI, FICHMAN Y, et al., 2021. Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress [J]. The Plant Journal, 105(2): 459-476.

DIAO P, CHEN C, ZHANG Y, et al., 2020. The role of NAC transcription factor in plant cold response [J]. Plant Signaling & Behavior, 15(9): 1785668.

DU Z, YOU S, YANG D, et al., 2022a. Comprehensive analysis of the NAC transcription factor gene family in *Kandelia obovata* reveals potential members related to chilling tolerance [J]. Frontiers in Plant Science, 13: 1048822.

DU Z, YOU S, ZHAO X, et al., 2022b. Genome-wide identification of WRKY genes and their responses to chilling stress in *Kandelia obovata* [J]. Frontiers in Genetics, 13: 875316.

FAN H, WANG W, 2017. Some thematic issues for mangrove conservation in China [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 56(3): 323-330. [范航清，王文卿，2017. 中国红树林保育的若干重要问题 [J]. 厦门大学学报(自然科学版)，56(3): 323-330.]

HAN D, DU M, ZHOU Z, et al., 2020. Overexpression of a *Malus baccata* NAC transcription factor gene *MbNAC*25 increases cold and salinity tolerance in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 21(4): 1198.

HIMES-CORNELL A, GROSE SO, PENDLETON L, 2018. Mangrove ecosystem service values and methodological approaches to valuation: where do we stand? [J]. Frontiers in Marine Science, 5: 00376.

JENSEN MK, LINDEMOSE S, DE MASI F, et al., 2013. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene *NCED*3 in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Open Bio, 3(1): 321-327.

JIANG WJ, SHU HS, CHEN ZM, et al., 2024. Cloning, expression, and bioinformatics analysis of *KoWRKY*43 gene in *Kandelia obovata* [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 36(8): 1832-1843. [蒋文骏，舒红锁，陈正满，等，2024. 秋茄 *KoWRKY*43 基因克隆、表达与生物信息学分析 [J]. 浙江农业学报，36(8): 1832-1843.]

KOU X, MAO C, WU M, et al., 2016. Divergent functions of *SNAC*4-9 and possible mechanisms for tomato adaptation to abiotic stresses [J]. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 92(1): 11-24.

KONG JY, YANC N, LUO W, et a1., 2024. Identification of NAC transcription factor genes *CsNAC*79 and *CsNAC*9 in tea Plant and their response to different abiotic stresses[J]．Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，44(4)：0572-0581．[孔洁玙，杨妮，罗微，等，2024. 茶树 NAC 转录因子基因 *CsNAC*79 和 *CsNAC*9 鉴定及其对非生物胁迫的响应 [J]. 西北植物学报，44(4): 0572-0581.]

LAN THI HOANG X, DU NHI NH, BINH ANH THU N, et al., 2017. Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses [J]. Current Genomics, 18(6): 483-497.

LIN P, 2003. The characteristics of mangrove wetlands and some ecological engineering questions in China [J]. Strategic Study of CAE, 5(6): 33-38. [林鹏，2003. 中国红树林湿地与生态工程的几个问题 [J]. 中国工程科学，5(6): 33-38.]

LIN R, ZHAO W, MENG X, et al., 2007. Rice gene *OsNAC*19 encodes a novel NAC-domain transcription factor and responds to infection by *Magnaporthe grisea* [J]. Plant Science, 172(1): 120-130.

LI X, WANG Y, DONG J, et al., 2022. Physiological and Biochemical Responses of *Kandelia obovata* to Upwelling Stress [J]. Water, 14(6): 899.

LI X-D, ZHUANG K-Y, LIU Z-M, et al., 2016. Overexpression of a novel NAC-type tomato transcription factor, *SlNAM*1, enhances the chilling stress tolerance of transgenic tobacco [J]. Journal of Plant Physiology, 204: 54-65.

LIU S, YANG S, LIU H, et al., 2023. Physiological and transcriptomic analysis of the mangrove species *Kandelia obovata* in response to flooding stress [J]. Marine Pollution Bulletin, 196: 115598.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 25(4): 402-408.

LU HJ, LI ZY, LIANG HY, et al., 2019. Expression and stress tolerance analysis of *NAC*24 from *Tamarix hispida* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 55(3): 54-63. [卢惠君，李子义，梁瀚予，等，2019. 刚毛柽柳 *NAC*24 基因的表达及抗逆功能分析 [J].

林业科学，55(3): 54-63.]

MASRI R, KISS E, 2023. The role of *NAC* genes in response to biotic stresses in plants [J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 126: 102034.

NAKASHIMA K, TRAN LS, VAN NGUYEN D, et al., 2007. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice [J]. The Plant Journal, 51: 617-630.

NAKASHIMA K, TAKASAKI H, MIZOI J, et al., 2012. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1819(2): 97-103.

NIZAM A, RAWOOF A, ADOT V, et al., 2024. Comparative root transcriptome analysis of *Kandelia candel* Druce and *Rhizophora mucronata* Lam. germinating propagules under salinity gradients reveal their tolerance mechanisms and ecological adaptations [J]. Plant Growth Regulation: 1-25.

OLSEN AN, ERNST HA, LEGGIO LL, et al., 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends in Plant Science, 10(2): 79-87.

OHNISHI T, SUGAHARA S, YAMADA T, et al., 2005. *OsNAC*6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice [J]. Genes & Genetic Systems, 80(2): 135-139.

POOTAKHAM W, SONTHIROD C, NAKTANG C, et al., 2022. A chromosome-scale reference genome assembly of yellow mangrove (*Bruguiera parviflora*) reveals a whole genome duplication event associated with the Rhizophoraceae lineage [J]. Molecular Ecology Resources, 22(5): 1939-1953.

QI JY, LI HP, YANG JH, et al., 2011. Cloning and sequence analysis of a Hevea cystatin gene (*HbCYS*1) and investigation of the tapping on its expression in the latex [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 32(5): 833-839. [戚继艳, 李和平, 阳江华, 等, 2011. 橡胶树 cystatin 基因 *HbCYS*1 的克隆及割胶应答 [J]. 热带作物学报, 32(5): 833-839.]

REN T, WANG J, ZHAO M, et al., 2017. Involvement of NAC transcription factor SiNAC1 in a positive feedback loop via ABA biosynthesis and leaf senescence in foxtail millet [J]. Planta, 247(1): 53-68.

ROYCHOUDHURY A, PAUL S, BASU S, 2013. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress [J]. Plant Cell Reports, 32(7): 985-1006.

SHAO H, WANG H, TANG X, 2015. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects [J]. Frontiers in Plant Science, 6: 156056.

SHI C, HAN K, LI L, et al., 2020. Complete chloroplast genomes of 14 mangroves: phylogenetic and comparative genomic analyses [J]. BioMed Research International, 2020: 1-13.

SINGH S, KOYAMA H, BHATI KK, et al., 2021. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement [J]. Journal of Plant Research, 134(3): 475-495.

SONG S-Y, CHEN Y, CHEN J, et al., 2011. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress [J]. Planta, 234(2): 331-345.

SOUER E, VAN HOUWELINGEN A, KLOOS D, et al., 1996. The *no apical meristem* gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. Cell, 85(2): 159-170.

SPEROTTO RA, RICACHENEVSKY FK, DUARTE GL, et al., 2009. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of *OsNAC*5, a new ABA-dependent transcription factor [J]. Planta, 230(5): 985-1002.

SUN LJ, WANG XR, NI XX, et al., 2017. The structure and expression of *EgrNAC*1 gene associated with stress response in *Eucalyptus grandis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 53(10): 60-69. [孙丽娟，王晓荣，倪晓祥，等，2017. 巨桉非生物逆境响应基因 *EgrNAC*1 的基因结构和表达分析 [J]. 林业科学，53(10): 60-69.]

TATONGJAI S, KRAICHAK E, KERMANEE P, 2021. Comparative anatomy and salt management of *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. (Lythraceae) grown in saltwater and freshwater [J]. PeerJ, 9: e10962.

TWENEBOAH S, OH S-K, 2017. Biological roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in solanaceous crops [J]. Journal of Plant Biotechnology, 44(1): 1-11.

WANG G, SINGH M, WANG J, et al., 2021. Effects of marine pollution, climate, and tidal range on biomass and sediment

organic carbon in Chinese mangrove forests [J]. Catena, 202: 105270.

WANG Y-S, GU J-D, 2021. Ecological responses, adaptation and mechanisms of mangrove wetland ecosystem to global climate change and anthropogenic activities [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 162: 105248.

WEI LM, WEN SY, MA JK, et al., 2022. Cloning，expression and promoter analysis of *LtAGO*1 from *Liriodendron tulipifera* [J]. Guihaia, 42(8): 1402-1416. [魏灵敏，温少莹，马际凯，等，2022. 北美鹅掌楸 *LtAGO*1 基因的克隆、表达及其启动子分析 [J]. 广西植物，42(8): 1402-1416.]

WU WZ, ZHAO ZX, YANG S, et al., 2022. The mangrove forest distribution and analysis of afforestation effect in Zhejiang Province [J]. Journal of Tropical Oceanography, 41(6): 67-74. [吴伟志，赵志霞，杨升，等，2022. 浙江省红树林分布和造林成效分析 [J]. 热带海洋学报，41(6): 67-74.]

YANG HF, ZHANG XQ, YU XW, et al., 2022. Cloning of *Salix psammophila SpsNAC*034 gene and analysis of its expression under various adversities [J]. Southwest China Journal of Agricultuml Sciences, 35(7): 1509-1519. [杨海峰，张新乾，于兴旺，等，2022. 沙柳 *SpsNAC034* 基因克隆及多种逆境表达分析 [J]. 西南农业学报，35(7): 1509-1519.]

YARRA R, WEI W, 2021. The NAC-type transcription factor *GmNAC*20 improves cold, salinity tolerance, and lateral root formation in transgenic rice plants [J]. Functional & Integrative Genomics, 21(3): 473-487.

YOO SD, CHO YH, SHEEN J, 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. Nature Protocols, 2(7): 1565-1572.

ZHANG BX, ZHU JB, LIU C, et al., 2024. Cloning and expression pattern analysis of *BnaNAC*14.1 gene in *Brassica napus* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 32(1): 60~69. [章冰馨，祝金博，刘翠，等，2024. 甘蓝型油菜 *BnaNAC*14.1 基因的克隆与表达模式分析 [J]. 农业生物技术学报，32(1): 60~69.]

ZHANG H, MA F, WANG X, et al., 2020. Molecular and functional characterization of *CaNAC*035, an NAC transcription factor from pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Frontiers in Plant Science, 11: 14.

ZHANG X, LONG Y, CHEN X, et al., 2021. A NAC transcription factor OsNAC3 positively regulates ABA response and salt tolerance in rice [J]. BMC Plant Biology, 21: 546.

ZHANG Y, SU SS, CHEN WT, et al., 2018. Full-length cDNA cloning and analysis of UDP-D-apiose UDP-D-xylose synthase gene *ClUAXS*2 in *Cunninghamia* lanceolata [J] Journal of Northwest Forestry University, 33(3): 82-90+143. [张颖，苏烁烁，陈婉婷，等，2018. 杉木木糖合成酶基因 *ClUAXS*2 的全长克隆与分析 [J]. 西北林学院学报，33(3): 82-90+143.]

ZHAO S, HONG HS, ZHANG LP, et al., 2007. Emergy value of mangrove ecosystem services in China [J]. Resources Science, 29(1): 147-154. [赵晟，洪华生，张珞平，等，2007. 中国红树林生态系统服务的能值价值 [J]. 资源科学，29(1): 147-154.]

ZHENG X, YE WW, ZHAO CQ, et al., 2023. Comparison of photosynthetic physiological characteristics of two mangrove plants in dry and rainy seasons in Dongzhaigang, Hainan [J]. Guihaia, 43(4): 649-657. [郑熊，叶文伟，赵从举，等，2023. 海南东寨港两种红树植物旱季和雨季的光合生理特征比较 [J]. 广西植物，43(4): 649-657.]

ZHONG QW, MA JK, JIA T, et al., 2023. Cloning and expression analysis of NAC transcription factor gene *TcNAC*2 from *Toona ciliata* var. *pubescens* under drought stress[J].Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 45(5):1051-1060. [钟秋蔚，马际凯，贾婷，等，2023. 毛红椿 *TcNAC*2 基因克隆及在干旱胁迫下的表达分析 [J]. 江西农业大学学报，45(5): 1051-1060.]

ZHOU ZG, YUE W, LI HQ, et al., 2024. Influence of tree species and intertidal elevations on the carbon storage of the Gaoqiao mangrove area in Zhanjiang, Guangdong Province [J]. Journal of Tropical Oceanography, 43(2): 108-120. [周治刚，岳文，李辉权，等，2024. 树种类型和潮滩高程对广东湛江高桥红树林碳储量的影响 [J]. 热带海洋学报，43(2): 108-120.]

ZHU M, HU Z, ZHOU S, et al., 2014. Molecular characterization of six tissue-specific or stress-inducible genes of NAC transcription factor family in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 33: 730-744.